



Juliana de Paulo Latuf

**“Investigação da frequência de núcleos 45,X por meio de
hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) em linfócitos e
mucosa oral de homens normais e sua aplicação a mosaicos
45,X/46,XY”**

Campinas

2013



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

Juliana de Paulo Latuf

**“Investigação da frequência de núcleos 45,X por meio de
hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) em linfócitos e
mucosa oral de homens normais e sua aplicação a mosaicos
45,X/46,XY”**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Andréa Trevas Maciel Guerra

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Juliana de Paulo Latuf e orientada pela Prof^ª Dr^ª Andréa Trevas Maciel Guerra.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Andréa Trevas Maciel Guerra", is written over a horizontal line.

Assinatura da Orientadora

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L357i Latuf, Juliana de Paulo, 1985-
Investigação da frequência de núcleos 45,X por meio de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) em linfócitos e mucosa oral de homens normais e sua aplicação a mosaicos 45,X/46,XY. / Juliana de Paulo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Andréa Trevas Maciel-Guerra.

Coorientador: Vera Lúcia Gil da Silva Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mosaicismo. 2. Cromossomos sexuais. 3. Hibridização *in situ* por fluorescência. 4. Transtornos do desenvolvimento sexual. I. Maciel-Guerra, Andréa Trevas, 1960-. II. Lopes, Vera Lúcia Gil da Silva, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of the frequency of 45,X nuclei by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on lymphocytes and buccal smear of normal men and its application to 45,X/46,XY mosaicism.

Palavras-chave em inglês:

Mosaicism

Sex chromosomes

Fluorescence *in situ* hybridization

Disorders of sex development

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Mestra em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Andréa Trevas Maciel-Guerra [Orientador]

Adriana Aparecida Siviero Miachon

Antonia Paula Marques de Faria

Data de defesa: 15-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JULIANA DE PAULO LATUF

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANDREA TREVAS MACIEL GUERRA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). VERA LÚCIA GIL DA SILVA LOPES

MEMBROS:

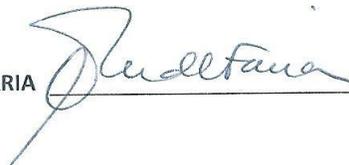
1. PROF(A). DR(A). ANDREA TREVAS MACIEL GUERRA



2. PROF(A). DR(A). ADRIANA APARECIDA SIVIERO MIACHON



3. PROF(A). DR(A). ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas

Data: 15 de agosto de 2013

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, como prova de mais um degrau alcançado por meio de seus esforços. E ao meu grande amor Alexandre, pois sem ele não teria sentido a palavra felicidade.

Agradecimentos

Aos meus pais Luiz e Edméa e as minhas irmãs Luciene, Luciana e Lucimeire pelo carinho, compreensão e apoio;

Ao meu noivo Alexandre, por toda a cumplicidade, apoio, dedicação e amor, sem você eu não estaria aqui;

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel-Guerra pela oportunidade, pelo aprendizado, dedicação, compreensão nestes anos;

Às minhas amigas Laiara, Mirian, Ana Laura pela amizade, confiança, apoio, paciência e aprendizado. Além de agradecer pelos momentos felizes que passamos no laboratório e por toda a colaboração com este trabalho.

Aos meus amigos Fernando, Alexandre, Renata, Mailme, Fernanda e muitos outros, que pude dividir os problemas e felicidades em todos esses anos de Unicamp.

Aos meus amigos funcionários do Laboratório de Citogenética Humana, Nilma, Jair e Ilária pelo aprendizado e experiências compartilhadas;

À Banca Examinadora pela contribuição na participação e elaboração desta tese;

Aos professores do Depto. de Genética Médica, por todo aprendizado proporcionado;

RESUMO

Quadros de ambiguidade genital e esterilidade com cariótipo 46,XY podem ser devidos a mosaico com linhagem 45,X não detectável no cariótipo em linfócitos de sangue periférico. Quando essa linhagem não é detectada, esses indivíduos deixam de ser investigados em relação a uma série de problemas clínicos. Este trabalho teve como objetivo verificar se a hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) em células de mucosa oral poderia ser empregada para detectar criptomosaicismo com linhagem 45,X em indivíduos com cariótipo 46,XY. A casuística foi composta por 19 homens saudáveis com idades entre 20 e 30 anos e cinco pacientes com distúrbios da diferenciação do sexo (DDS) com idades entre 5 e 23 anos, quatro com mosaico 45,X/46,XY e um com disgenesia testicular 46,XY associada a déficit de crescimento. Após confirmar que os jovens saudáveis tinham cariótipo 46,XY em 50 metáfases de linfócitos de sangue periférico, foi realizada análise por FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y em 1.000 núcleos interfásicos de linfócitos de sangue periférico e 1.000 de mucosa oral, seguida de comparação da proporção de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X nos dois tecidos. A mesma análise foi feita nos cinco pacientes com DDS. A distribuição da proporção dos núcleos interfásicos de linfócitos e mucosa oral contendo apenas o sinal do X nos jovens saudáveis foi compatível com a distribuição normal, e número superior a 12:1.000 em linfócitos e 13:1.000 em mucosa oral devem ser considerados indicativos de mosaicismo em nosso laboratório. A frequência desses núcleos nos dois tecidos não diferiu significativamente ($p=0,6855$). Nos cinco pacientes com DDS a frequência de núcleos contendo apenas o sinal do X diferiu significativamente da observada em indivíduos normais em linfócitos ($p=0,0008$) e mucosa oral ($p=0,0008$). No paciente com cariótipo prévio 46,XY a linhagem 45,X foi confirmada por FISH em metáfases, e em um dos casos de mosaicismo foram detectadas linhagens celulares adicionais. Também não houve diferença significativa entre a frequência de núcleos contendo apenas o sinal do X nos dois tecidos desses pacientes ($p=0,3750$). Estes resultados indicam que a pesquisa de mosaicismo com

linhagem 45,X em indivíduos com DDS ou esterilidade e cariótipo 46,XY pode ser feita por meio de FISH em mucosa oral, com vantagens evidentes em termos de custo e rapidez, além de ser feita a partir de tecido obtido de modo não invasivo.

Palavras-chave: mosaicismo; cromossomos sexuais; hibridização in situ por fluorescência; transtornos do desenvolvimento sexual.

ABSTRACT

Ambiguous genitalia and sterility with a 46,XY karyotype may be due to mosaicism with a 45, X karyotype not detectable in peripheral blood lymphocytes. When this cell line is not detected, these individuals fail to be investigated over a range of clinical problems. This study aimed to verify whether fluorescence in situ hybridization (FISH) in cells from buccal smear could be employed to detect cryptomosaicism with a 45,X cell line in individuals with a 46,XY karyotype. The sample consisted of 19 healthy men aged 20 to 30 years and five patients with disorders of sex development (DSD) aged 5 to 23 years, four with mosaicism 45,X/46,XY and one with testicular dysgenesis 46, XY associated with growth deficiency. After confirming that the healthy young men had a 46,XY karyotype in 50 metaphases from peripheral blood lymphocytes, FISH analysis with probes specific for chromosomes X and Y was done in 1,000 nuclei from peripheral blood lymphocytes and 1,000 from buccal smear, followed by comparison of the proportion of nuclei containing only the signal of the X chromosome in these tissues. The same analysis was performed in five patients with DDS. The distribution of the proportion of interphase nuclei of lymphocytes and buccal smear containing only the X signal in healthy young was consistent with normal distribution; a number greater than 12:1,000 in lymphocytes and 13:1,000 in buccal smear should be considered indicative of mosaicism in our laboratory. The frequency of these nuclei in both tissues did not differ significantly ($p = 0.6855$). In patients with DDS the frequency of nuclei containing only the X signal differed significantly from that observed in normal individuals both in lymphocytes ($p = 0.0008$) and buccal smear ($p = 0.0008$). In the patient with a prior 46,XY karyotype, a 45,X cell line was confirmed by FISH in metaphases, and in one case of mosaicism additional cell lines were detected. There was also no significant difference between the frequency of nuclei containing only the X signal in the two tissues of these patients ($p = 0.3750$). These results indicate that investigation of mosaicism with 45,X cell line in individuals with 46,XY DSD or sterility can be done

by FISH in cells from buccal smear, with obvious advantages in terms of cost and speed, using a tissue obtained noninvasively.

Keywords: mosaicism; sex chromosomes; fluorescence in situ hybridization; disorders of sex development.

Lista de abreviaturas

DDG	Distúrbios da diferenciação gonadal
DDS	Distúrbios da diferenciação do sexo
DGM	Disgenesia gonadal mista
DGP XY	Disgenesia gonadal parcial XY
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FISH	Hibridação <i>in situ</i> com fluorescência
FSH	Hormônio folículo estimulante
GH	Hormônio de crescimento
GIEDDS	Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo
LH	Luteinizing hormone (Hormônio Luteinizante)
PCR	Reação em cadeia por polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
ST	Síndrome de Turner
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

Lista de ilustrações

Figuras

Figura 1	Classificação dos cromossomos de acordo com a posição do centrômero e um cariótipo montado ilustrando a posição correta dos cromossomos com base no padrão de banda e posição dos centrômeros	14
Figura 2	Metáfase de sangue periférico marcada com sondas da região 22q11, mostrando deleção da região em uma das cópias do cromossomo 22	14

Tabelas

Tabela 1	Diagnóstico clínico e constituição cromossômica dos 5 pacientes com distúrbios da diferenciação do sexo que fizeram parte da casuística deste trabalho.	28
Tabela 2	Ampliação da análise de metáfases obtidas de linfócitos de sangue periférico de homens saudáveis por meio de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y.	35

Tabela 3	Análise de núcleos interfásicos de linfócitos de sangue periférico e mucosa oral de homens saudáveis por meio de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y	36
Tabela 4	Análise de núcleos interfásicos de linfócitos de sangue periférico e mucosa oral de pacientes com DDS por meio de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y	37

Quadros

Quadro 1	Incidência de anomalias cromossômicas sexuais.	16
Quadro 2	Distúrbios da diferenciação gonadal com disgenesia gonadal e o fenótipo correspondente	23

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract.....	lix
1. Introdução.....	15
a) <i>Anomalias cromossômicas</i>	16
b) <i>Anomalias dos cromossomos sexuais</i>	19
c) <i>O cariótipo 45,X/46,XY</i>	20
i. <i>Síndrome de Turner</i>	20
ii. <i>Disgenesia gonadal mista</i>	25
iii. <i>Hermafroditismo verdadeiro</i>	26
d) <i>Disgenesias testiculares associadas a cariótipo 46,XY</i>	28
i. <i>Disgenesia gonadal pura</i>	29
ii. <i>Disgenesia gonadal parcial XY</i>	30
2. Justificativa.....	31
3. Objetivos.....	34
4. Casuística e Métodos.....	36
a) <i>Casuística</i>	37
b) <i>Métodos</i>	38
i. <i>Análise citogenética por bandamento G</i>	39
ii. <i>FISH (hibridação in situ com fluorescência) em linfócitos</i>	40
iii. <i>FISH (hibridação in situ com fluorescência) em mucosa oral</i>	42

iv.	<i>Análise estatística</i>	43
5.	Resultados.....	44
6.	Discussão	51
7.	Conclusão.....	57
8.	Referências Bibliográficas.....	59
9.	Anexos	66
a)	<i>Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética</i>	67
b)	<i>Anexo 02. Termo de consentimento livre e esclarecido</i>	70
c)	<i>Anexo 03. Ficha de coleta de dados do grupo controle</i>	75
d)	<i>Anexo 04. Protocolo de Cariótipo de sangue periférico por banda G</i>	78
e)	<i>Anexo 05. Protocolo da FISH em sangue periférico</i>	81
f)	<i>Anexo 06. Protocolo da FISH em mucosa oral</i>	85

1. Introdução

a) *Anomalias cromossômicas*

As anomalias cromossômicas são responsáveis por uma proporção significativa das doenças genéticas, ocorrendo em aproximadamente um de cada 150 nativos, e podem levar tanto a anomalias congênitas e (ou) retardo mental quanto a perda gestacional. São vistas em 50% dos abortos espontâneos do primeiro trimestre e 20% do segundo trimestre. Assim, são uma importante causa de morbidade e de mortalidade [1]. Podem envolver um ou mais autossomos, os cromossomos sexuais ou ambos simultaneamente, e podem ser numéricas ou estruturais.

Dentre as anomalias cromossômicas clinicamente significativas predominam as anomalias numéricas, em que há aumento ou diminuição do número cariotípico normal da espécie humana, e que são subdivididas em euploidias (em que há aumento ou diminuição de um conjunto cromossômico haploide) e aneuploidias (em que há aumento ou diminuição de cromossomos de um ou mais pares, mas não de todos eles). Ambas são observadas em abortos espontâneos e fetos natimortos; já em nativos são encontradas quase que exclusivamente aneuploidias [2; 3].

Do ponto de vista clínico, as aneuploidias autossômicas estão quase sempre associadas a distúrbios de crescimento e de desenvolvimento neuropsicomotor e anomalias congênitas. Já aquelas que envolvem cromossomos sexuais podem levar a baixa ou alta estatura, a maioria dos indivíduos tem inteligência normal, nem sempre há quadro dismórfico associado e costumam ser mais evidentes as alterações da função gonadal [2; 3].

Dentre as anomalias estruturais, temos deleções, inserções, inversões peri e paracêntricas, cromossomos em anel e isocromossomos, porém as translocações recíprocas são as mais comuns. Estas, em geral, não têm efeito fenotípico, embora possam determinar um aumento do risco de prole anormal [2; 3].

As causas das aneuploidias ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que o mecanismo cromossômico mais comum é a falta de disjunção meiótica, ou seja, falha da separação dos cromossomos durante uma das duas divisões meióticas, em geral durante a meiose I. As conseqüências da falta de disjunção durante a meiose I e II são diferentes. Caso o erro ocorra durante a primeira divisão meiótica, o gameta com 24 cromossomos contém o membro paterno e materno do par. Se a divisão envolvida for a meiose II, o gameta com o cromossomo extra contém duas cópias do cromossomo paterno ou materno [2; 3].

A falta de disjunção pode também ocorrer numa divisão mitótica após a formação do zigoto. Caso isto aconteça durante a primeira divisão mitótica do zigoto ou durante a divisão de um dos blastômeros, pode ocasionar mosaicismos clinicamente significativos, sendo que entende-se por mosaicismos a existência de duas ou mais linhagens cromossomicamente distintas, originárias de um único zigoto. Além da falta de disjunção, o mosaicismos pode ser o resultado de uma perda cromossômica, seja por atraso anafásico ou pela presença de um cromossomo estruturalmente anômalo (como anéis ou isocromossomos), o que impede sua viabilidade [2; 3].

Estudos no período inicial do desenvolvimento embrionário após fertilização *in vitro* sugerem que o mosaicismos cromossômico por falta de disjunção cromossômica, atraso anafásico ou alterações estruturais ocorre em 50% dos embriões até o estágio de oito células e 75% dos blastocistos [4].

O grau de mosaicismos está relacionado ao período de desenvolvimento em que surgiu(ram) a(s) linhagem(ns) celular(es) adicional(is) - quanto mais precoce, maior a proporção de células anômalas e, portanto, maior a possibilidade de haver conseqüências clínicas perceptíveis. Se apenas uma pequena fração das células corporais tiver constituição cromossômica anormal, o mosaicismos pode nunca ser detectado [5].

A análise cromossômica tradicional é feita por meio do exame do cariótipo, a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico. Nesse exame, o

número e a estrutura dos cromossomos é analisada após estes serem ordenados de acordo com seu tamanho, posição do centrômero (metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos) e padrões de banda (Figura 1). A partir do final dos anos 1980, passou a ser incorporada paulatinamente à rotina de análise cromossômica a hibridação *in situ*, metodologia utilizada para a visualização de sequências definidas de ácidos nucleicos em preparações celulares por meio de sondas, ou seja, hibridação de sequências complementares. Esse método foi elaborado por Pardue e Gall em 1969 [6], e permite a detecção de sequências específicas de DNA/RNA em cromossomos metafásicos, bem como em núcleos interfásicos [7; 8].

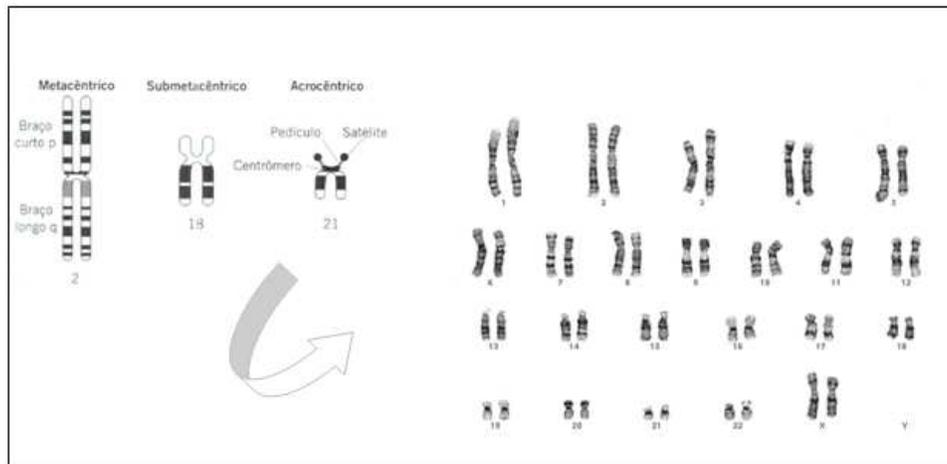


Figura 1. Classificação dos cromossomos de acordo com a posição do centrômero e exemplo de um exame de cariótipo (46,XX) [3].

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (*fluorescence in situ hybridisation*, FISH) consiste no uso de sondas de DNA marcado por fluorescência que permitem identificar todo um cromossomo (“pintura cromossômica”), um local específico no cromossomo, ou apenas sua região centromérica (Figura 2). Tem sido aplicada na identificação de anomalias estruturais (como deleções, duplicações, translocações e na determinação da origem de fragmentos cromossômicos de origem desconhecida) e também na pesquisa de mosaicismo,

pois permite a análise rápida de centenas de células, e pode ser utilizada tanto em metáfases quanto em núcleos interfásicos de diversos tecidos [9].

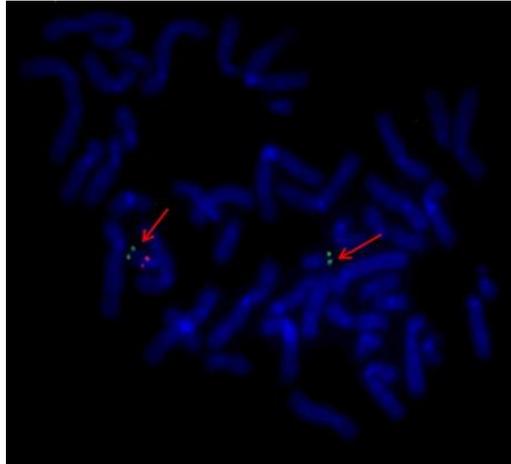


Figura 2. Metáfase de sangue periférico marcada com sondas da região 22q11, mostrando deleção da região em uma das cópias do cromossomo 22. (Fonte: Laboratório de Citogenética Humana – FCM/Unicamp.)

b) Anomalias dos cromossomos sexuais

As anomalias dos cromossomos sexuais ocorrem em frequência um pouco menor que as anormalidades autossômicas, incidindo em cerca de 1 em 500 nascimentos, e os fenótipos associados a elas são, em geral, menos exuberantes do que os associados a distúrbios autossômicos, já que a inativação do X e o conteúdo aparentemente baixo de genes do Y reduzem as consequências clínicas do desequilíbrio do material cromossômico [3; 10].

Assim como as anomalias dos autossomos, podem ser numéricas ou estruturais e podem estar presentes em todas as células ou em forma de mosaico. Sua incidência em nativos está resumida no Quadro 1 (adaptado de Nussbaum *et al.*[3]).

Algumas síndromes bem definidas associadas aos cromossomos sexuais são causas importantes de esterilidade (síndromes de Turner e Klinefelter) ou baixa estatura (síndrome de Turner); outras são associadas a estatura mais elevada, porém geralmente com desenvolvimento puberal e fertilidade normais (47,XYY, 47,XXX). Além disso, são conhecidos diferentes quadros associados ao cariótipo 45,X/46,XY, como será visto adiante: síndrome de Turner (ST), disgenesia gonadal mista (DGM), hermafroditismo verdadeiro e esterilidade em homens com genitália masculina. Essa variabilidade fenotípica está associada às diferentes proporções das linhagens 45,X e 46,XY no organismo como um todo e nas gônadas em particular [11; 12].

c) *O cariótipo 45,X/46,XY*

i. *Síndrome de Turner*

A ST foi descrita em 1938 por Henry H. Turner, que descreveu a tríade infantilismo sexual, pescoço alado e cúbito valgo em pacientes do sexo feminino com baixa estatura [13]. Apenas em 1959, porém, Ford *et al.* descreveram o cariótipo 45,X e constataram que a etiologia dessa síndrome consistia em uma anomalia nos cromossomos sexuais [14], definida hoje como a presença de um cromossomo X funcional e a perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual (X ou Y) em paciente fenotipicamente feminino, com uma ou mais características clínicas atribuídas à síndrome [15]. Apesar do cariótipo mais conhecido ser o 45,X, o uso de técnicas de bandamento, o aumento do número de células analisadas nos cariótipos e a avaliação de outros tecidos detecta uma frequência maior de indivíduos com mosaïcismo e anomalias estruturais [16].

Quadro 1: Incidência de anomalias de cromossomos sexuais (adaptado de Nussbaum *et al.* [3]).

Fenótipo	Distúrbio	Cariótipo	Incidência Aproximada
Masculino	S. de Klinefelter e quadros klinefelterianos	47,XXY	1/1.000 homens
		48,XXXY	1/25.000 homens
		Outros (48,XXYY; 49,XXXYY; mosaicos)	1/10.000 homens
	S. 47,XYY	47,XYY	1/1.000 homens
	Outras anomalias	45,X/46,XY	1/1.500 homens
	Homens XX	46,XX	1/20.000 homens

Feminino	S. de Turner	45,X	1/1.500 mulheres
		46,X, i(Xq)	1/50.000 mulheres
		Outras anomalias numéricas e estruturais	1/15.000 mulheres
	Trissomia do X	47,XXX	1/1.000 mulheres
	Outras anomalias do X	48,XXXX 49,XXXXX	1/3.000 mulheres

A incidência da ST é em torno de 1:2500 nascidas vivas, porém acredita-se que cerca de 99% dos conceptos com essa constituição cromossômica 45,X são abortados espontaneamente [17]. Em cerca de 80% dos casos em nativos, o X funcional foi herdado da mãe, indicando haver uma propensão maior a perda e alteração do cromossomo sexual paterno, porém o risco de recorrência é considerado baixo [18].

Além do cariótipo 45,X podem também ser encontradas as seguintes anomalias cromossômicas [19]:

- mosaicos sem anomalias estruturais, como 45,X/46,XX; 45,X/47,XXX; 45,X/46,XY e 45,X/47,XYY;
- aberrações estruturais dos cromossomos X e Y com ou sem mosaicismo com linhagem 45,X (isocromossomos, cromossomos em anel, deleções);
- translocações X; X, X; autossomo e Y; autossomo.

Os diversos sinais dismórficos e malformações encontrados são decorrentes de alguns mecanismos fisiopatológicos, como [20]:

- Distúrbio do crescimento esquelético – baixa estatura com distúrbio do crescimento dos ossos longos e da base do crânio, face característica com micrognatia, cúbito valgo, pescoço curto, peito escavado, tórax em escudo, palato ogival; a maioria das alterações esqueléticas é explicada pela haploinsuficiência do gene *SHOX*, localizado na região pseudo-autossômica do braço curto dos cromossomos sexuais [21].
 - Anomalias das células germinativas – hipogonadismo primário e esterilidade; risco de tumores em pacientes com cromossomo Y em sua constituição cromossômica (gonadoblastoma, disgerminoma).
 - Sequência da obstrução linfática jugular – falha na conexão entre os dutos linfáticos e as veias jugulares levando a higroma cístico na região do pescoço e

distensão dos linfáticos periféricos; a regressão do linfedema tem como consequência diversas manifestações clínicas, como: implantação baixa dos cabelos na nuca; pavilhões auriculares inclinados para trás; pescoço alado ou, na recém-nascida, redundância de pele no pescoço; linfedema em dorso de mãos e(ou) pés; predominância de padrão dermatoglífico em verticilo nas polpas digitais; e unhas hiperconvexas ou displasia ungueal grave.

Pode-se observar também, outras anomalias como: mamilos hipoplásicos, invertidos ou com aumento da distância intermamilar; pregas epicânticas; ptose palpebral; estrabismo; e múltiplos nevos pigmentados.

A baixa estatura está presente em cerca de 95% dos casos. Além de apresentarem retardo de crescimento intra-uterino, a velocidade de crescimento também é lenta e praticamente não há estirão puberal. A adição desses fatores resulta numa altura final cerca de 15 a 20 centímetros a menos que a população geral; em mulheres brasileiras com ST, a altura final espontânea é, em média, de 144,8 cm [22].

Os indivíduos com ST podem apresentar ainda anomalias cardiovasculares (presentes em 20 a 30% dos casos, incluindo valva aórtica bicúspide, coarctação da aorta e insuficiência mitral, sendo a principal causa de óbito); anomalias renais e renovasculares (30 a 40% dos casos, incluindo rim em ferradura, duplicação do sistema coletor, obstrução da junção ureteropélvica e infecções no trato urinário); doença tireoidiana auto-imune; intolerância a carboidratos; hipertensão essencial (7%); e deficiência auditiva condutiva, neurossensorial ou mista [23 - 25].

A falência gonadal é observada na maioria das pacientes, nas quais os concentrações plasmáticas das gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), são altas até 2 a 5 anos de vida e tornam a se elevar a partir da época em que normalmente deveria se iniciar a puberdade, atingindo, em alguns anos, concentrações características da menopausa [26]. As gônadas não contêm células germinativas ou células responsáveis pela produção

dos esteróides sexuais, mas apenas estroma ovariano e tecido conjuntivo cicatricial, caracterizando uma gônada disgenética [20].

Em algumas pacientes, porém, há evidências de função ovariana na puberdade. Segundo Lippe e cols. [20], 21% das pacientes apresentam desenvolvimento mamário espontâneo e, dentre elas, 50% chegam a apresentar ciclos menstruais até o início da vida adulta. A evolução da puberdade espontânea é bastante variável, podendo ser lenta ou incompleta. No decorrer dos anos há aceleração no processo natural de degeneração dos ovócitos, ao mesmo tempo em que ocorre a aceleração da fibrose do estroma na maior parte dos casos [27].

Também pode ser observado aumento da frequência de doenças auto-imunes, como tireoidite linfocítica crônica, hipertireoidismo, vitiligo e alopecia [15]. As pacientes apresentam inteligência normal, porém é frequente haver problemas psicossociais [28].

O diagnóstico é realizado por meio de cariótipo, usualmente de sangue periférico. Por ser muito frequente a presença de mosaicismo, a contagem de metáfases deve ser elevada para 50 células, pois quanto maior a contagem maior a chance de identificação de outras linhagens celulares [17].

A grande frequência de mosaicismo pode dificultar o diagnóstico e exigir medidas adicionais para complementar o estudo citogenético de rotina. Por exemplo, quando há suspeita clínica, porém o cariótipo em sangue periférico é 46,XX, é necessário realizar análises de outros tecidos visando à identificação de mosaicismo com linhagem 45,X. Já quando existem cromossomos marcadores, eles devem ser caracterizados utilizando técnicas moleculares como FISH com sondas centroméricas de X e Y ou reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção de sequências específicas do cromossomo Y, uma vez que a presença de linhagem com esse cromossomo determina risco aumentado de surgimento de neoplasias nas gônadas disgenéticas [29; 30]. Pelo mesmo motivo, esses estudos também têm sido realizados nos casos em que somente uma linhagem 45,X é encontrada no cariótipo convencional [29 - 32].

Uma vez diagnosticada a ST, é fundamental investigar a presença das anomalias congênitas descritas no tópico anterior e realizar seguimento clínico rigoroso, incluindo acompanhamento periódico de audição, pressão arterial, função tireoidiana, perfil lipídico, tolerância a carboidratos e funções renal e hepática para detecção e tratamento precoce de afecções adquiridas [25].

O tratamento das pacientes envolve ainda [15; 25]:

- Terapia com hormônio de crescimento (hGH) para aumentar a velocidade de crescimento e a altura final;
- Reposição hormonal para desenvolvimento puberal, manutenção dos caracteres sexuais secundários e mineralização óssea adequada;
- Utilização de técnicas de fertilização assistida com doação de óvulos.

ii. *Disgenesia gonadal mista*

A DGM, termo hoje reservado aos pacientes com cariótipo 45,X/46,XY, é caracterizada pela presença de uma gônada disgenética e um testículo disgenético contra-lateral, ou ainda de testículos disgenéticos bilateralmente com risco elevado para o desenvolvimento de neoplasia gonadal, presença de derivados de Müller e graus variados de ambiguidade genital [33; 34]. A DGM é uma condição rara, mas sempre deve ser considerada entre as etiologias de ambiguidade genital [34].

Entende-se por gônada disgenética (ou em fita) aquela composta de tecido fibroso vascularizado, sem função hormonal nem capacidade de produção de gametas e que não contém estruturas que permitam caracterizá-la como ovário ou testículo. Por sua vez, o testículo disgenético é caracterizado de forma histológica pela presença de anomalias tubulares e intersticiais em graus variáveis, associadas a fibrose e hialinização, e clinicamente por anomalias na

diferenciação dos dutos de Wolff, na virilização dos genitais externos e na regressão dos dutos de Müller, como consequência de função deficiente das células de Leydig e(ou) de Sertoli durante o período embrionário. Essa deficiência funcional é evidenciada no período pós-natal pela baixa produção de andrógenos e de hormônio anti-mülleriano [19].

Nos indivíduos com DGM o mosaicismos 45,X/46,XY pode ser explicado por perda cromossômica em decorrência de atraso anafásico ou alteração estrutural do cromossomo Y. Em alguns casos a linhagem 45,X pode não ser facilmente identificada, particularmente quando é analisado um pequeno número de células. Outras alterações numéricas como 45,X/47,XYY já foram relatadas; anomalias estruturais, como cromossomo Y em anel ou isocromossomo, são frequentemente presentes, levando ao surgimento secundário da linhagem 45,X [2; 34].

A DGM abrange fenótipos que variam desde virilização quase completa, com criptorquidia e (ou) hipospádia peniana, até virilização discreta em uma genitália predominantemente feminina. Em vista da presença de linhagem 45,X, pode haver quadro semelhante ao da ST, sendo indispensável excluir a presença de anomalias congênitas comuns nessa condição e realizar seguimento clínico idêntico ao de pacientes com essa síndrome [34].

iii. Hermafroditismo verdadeiro

O hermafroditismo verdadeiro, ou distúrbio da diferenciação do sexo ovário-testicular, é uma condição rara, com cerca de 400 casos descritos na literatura, caracterizada pela presença de tecido ovariano e testicular no mesmo indivíduo. A apresentação clínica varia de homem normal e fértil até mulher normal e fértil, mas na maioria dos casos há ambiguidade genital [35].

O diagnóstico é obrigatoriamente histopatológico, dependendo da presença de tecido testicular (túbulos seminíferos, com ou sem espermatozoides)

e tecido ovariano (com folículos) no mesmo indivíduo, em uma mesma gônada (denominada ovotestis) ou em gônadas opostas. Pode ser classificado, de acordo com o tipo de gônada presente e sua localização, em hermafroditismo lateral (quando há ovário de um lado e testículo do outro); bilateral (ovotestis em ambos os lados) ou unilateral (ovotestis de um lado e, do outro, ovário, testículo, gônada disgenética ou ausência de tecido gonadal) [35].

A frequência das diversas constituições cromossômicas dos hermafroditas varia de acordo com a região estudada. Há predomínio evidente do cariótipo 46,XX na África e do 46,XY no Japão e em algumas regiões da América do Sul. Porém, de um modo geral, cerca de 60% apresentam cariótipo 46,XX; 20% quimeras 46,XX/46,XY ou anomalias numéricas ou estruturais dos cromossomos sexuais (incluindo o cariótipo 45,X/46,XY e suas variantes); e 10 a 20% 46,XY [35].

Quando o diagnóstico é feito precocemente, a melhor opção de criação costuma ser o sexo feminino, uma vez que o tecido ovariano tem melhor capacidade funcional que o testicular. Nesses casos, deve ser preservada a porção ovariana das gônadas, com possibilidade de puberdade feminina espontânea e até mesmo de fertilidade. Em indivíduos criados no sexo masculino diagnosticados tardiamente e naqueles com bom desenvolvimento fálico e ausência de útero deve ser preservado o tecido testicular e o desenvolvimento puberal deve ser acompanhado cuidadosamente, uma vez que pode ser necessária terapia de reposição com andrógenos. Uma vez definido o sexo de criação, devem ser feitas correções cirúrgicas dos genitais internos e externos para adaptação ao sexo escolhido [35].

iv. Esterilidade em indivíduos com genitália masculina

Há diferenças significativas na proporção dos diferentes fenótipos associados ao cariótipo 45,X/46,XY entre os casos que são averiguados no período pós-natal e aqueles diagnosticados no período pré-natal. Enquanto nos casos em que esse mosaico é diagnosticado após o nascimento predomina o

quadro de ST [37], naqueles detectados por diagnóstico pré-natal cerca de 90 a 95% apresentam fenótipo masculino normal [36; 37]. Nesses casos em que os genitais externos são normais pode haver algum grau de disgenesia testicular e consequente esterilidade, que passa a ser a causa do diagnóstico desses indivíduos [36; 38; 39; 40].

De fato, em um estudo realizado por Patsalis *et al.* [40] com 17 pacientes com uma linhagem 45,X associada a uma segunda linhagem celular com cromossomo Y estruturalmente normal ou anômalo, em dois casos o quadro era de esterilidade. Além disso, em uma amostra de 14 homens com quadro de oligospermia grave ou azoospermia analisados por Siffroi *et al.* [39], seis apresentavam mosaicismo 45,X/46,XY, demonstrando que esse mosaico é compatível com a presença de genitais masculinos normais e queixas restritas à questão da fertilidade.

d) Disgenesias testiculares associadas a cariótipo 46,XY

Entre os distúrbios da diferenciação do sexo (DDS), o grupo de anomalias associadas a disgenesia gonadal (Quadro 2) vem crescendo nos últimos anos com a inclusão de quadros sindrômicos decorrentes de mutações em genes autossômicos recentemente identificados, participantes da diferenciação gonadal [10].

Quadro 2. Distúrbios da diferenciação gonadal associados a disgenesia gonadal e fenótipo correspondente [19].

Nomenclatura	Fenótipo*
Disgenesia gonadal pura (46,XX e 46,XY)	F
Disgenesia gonadal parcial XY	A
Disgenesia gonadal mista	A
Disgenesia gonadal associada a doença renal	F/A
Disgenesia gonadal associada a displasia camptomélica	F/A
Síndrome de Turner	F
Aberrações estruturais do cromossomo X sem fenótipo "Turner"	F
Síndrome de Klinefelter	M

*Fenótipo: F= feminino / A= ambíguo / M= masculino

Dentre essas disgenesias gonadais destaca-se a disgenesia gonadal pura 46,XY e a disgenesia gonadal parcial XY, na qual, assim como na DGM, são encontradas gônadas disgenéticas e testículos disgenéticos.

i. Disgenesia gonadal pura

O termo disgenesia gonadal pura é aplicado a indivíduos com fenótipo feminino, sem ambiguidade genital, com a presença de genitais internos femininos, gônadas disgenéticas e cariótipo normal (46,XX ou 46,XY) [41; 19].

A disgenesia gonadal pura XY é entidade geneticamente heterogênea, caracterizada pelo fenótipo feminino com estatura normal em indivíduos com cariótipo 46,XY e gônadas disgenéticas, com risco elevado para o desenvolvimento de tumores gonadais. Cerca de 20 a 30% dos casos de disgenesia gonadal pura XY desenvolvem gonadoblastoma e/ou disgerminoma [19; 42]. Habitualmente, o diagnóstico é feito na adolescência por ausência de desenvolvimento puberal e gonadotrofinas elevadas [19; 43].

ii. *Disgenesia gonadal parcial XY*

Também chamada de disgenesia gonadal incompleta ou pseudo-hermafroditismo masculino disgenético, a disgenesia gonadal parcial XY (DGP XY) é caracterizada pela presença de cariótipo 46,XY, sem mosaicismo, em indivíduos com diferenciação testicular parcial, presença de derivados dos dutos de Müller e ambiguidade genital sem sinais clínicos da síndrome de Turner. A histologia gonadal na DGP XY é variável, porém é comum observar túbulos seminíferos hipoplásicos associados a áreas semelhantes ao estroma ovariano. A virilização da genitália externa e interna é inversamente proporcional ao grau de disgenesia e há risco aumentado de transformação neoplásica das gônadas, com a ocorrência de gonadoblastomas, além de seminomas e disgerminomas. Na maioria dos casos a etiologia é desconhecida, mas já foram descritas mutações no gene *SRY* e no gene *NR5A1* (tanto em heterozigose quanto em homozigose) [41; 44].

A DGP XY apresenta o mesmo fenótipo gonadal e genital da DGM. A distinção entre esses dois quadros se dá por meio do exame de cariótipo, que deve ser complementado por FISH nos casos em que é alta a suspeita de mosaicismo, buscando afastar com alto grau de probabilidade a presença de linhagem 45,X. Esse diagnóstico diferencial é essencial para estabelecer a necessidade de investigação de anomalias congênitas e doenças adquiridas, como já foi mencionado nos tópicos anteriores [41; 45].

2. Justificativa

O cariótipo 45,X/46,XY pode ser encontrado em indivíduos com diferentes fenótipos: gônadas disgenéticas, genitais femininos e ST; testículos disgenéticos bilaterais ou associados a gônada disgenética, e ambiguidade genital (DGM); tecido ovariano e testicular e ambiguidade genital (hermafroditismo); e esterilidade em indivíduos com genitais masculinos normais.

Vários pesquisadores têm se debruçado sobre a questão do diagnóstico de mosaicismo com linhagem contendo cromossomo Y em pacientes com ST e cariótipo 45,X aparentemente homogêneo. No entanto, é pouco estudada a questão inversa, ou seja, as estratégias de detecção de linhagem 45,X em indivíduos com ambiguidade genital ou esterilidade e cariótipo 46,XY aparentemente homogêneo. Nesses indivíduos, a falta de detecção do mosaicismo faz com que deixem de ser investigados em relação a uma série de problemas clínicos congênitos e outros que podem surgir ao longo da vida.

A presença de mosaicismo em baixa frequência pode não ser detectada pela análise de um pequeno número de células em linfócitos (de origem mesodérmica), como ocorre no exame de cariótipo rotineiro. Essa detecção pode depender da análise de diferentes tecidos, do estudo de grande número de células e de maior sensibilidade das técnicas empregadas.

O estudo do cariótipo a partir de culturas de fibroblastos (de origem ectodérmica) vem sendo empregado na pesquisa de mosaicismo, porém é feito por meio de procedimento mais invasivo (biópsia de pele), que exige maior tempo de cultura e maior gasto de material de consumo e de recursos humanos, trazendo, portanto, maior custo, além de ser mais susceptível a contaminação. Nesse tipo de cultura há ainda resistência frequente das células à ação da colchicina e possibilidade de ocorrência de pseudomosaicismo *in vitro*. Esta, portanto, não é a técnica ideal para ser empregada como rotina no diagnóstico.

Um método não invasivo, mais simples e barato, como a análise de células obtidas de raspado do epitélio bucal (também de origem ectodérmica) por

meio da aplicação da técnica de FISH seria de grande auxílio na detecção rotineira de mosaicismo em baixa frequência nesses pacientes [46; 47].

3. Objetivos

O **objetivo geral** deste trabalho foi verificar se a técnica de FISH em células de mucosa oral pode ser empregada na investigação de criptomosaicismo com linhagem 45,X em indivíduos com DDS ou esterilidade e cariótipo 46,XY.

Já os **objetivos específicos** foram:

- Verificar a frequência de núcleos 45,X por meio da técnica de FISH usando sondas específicas para os cromossomos X e Y em linfócitos e mucosa oral de adultos jovens normais;
- Verificar se há diferença significativa entre a frequência de núcleos 45,X por meio de FISH nos dois tecidos desses indivíduos.
- Analisar os resultados de FISH em linfócitos e mucosa oral de indivíduos com DDS e mosaicismo 45,X/46,XY previamente confirmado ou suspeitado.

4. Casuística e Métodos

a) *Casuística*

A casuística foi composta por 19 homens saudáveis com idade entre 21 e 29 anos (média: 23 anos) (casos 1 a 19). Foram critérios de exclusão: antecedentes pessoais de genitoplastias (orquidopexia, uretroplastia) e terapia de reposição com hormônios masculinos para indução e (ou) manutenção de caracteres sexuais secundários masculinos; antecedentes pessoais de anomalias congênitas cardíacas, renais e de vias urinárias e de doença tireoidiana auto-imune; e baixa estatura.

Um segundo grupo analisado foi constituído por cinco pacientes com distúrbios da diferenciação do sexo (DDS) atendidos no ambulatório do Grupo Interdisciplinar de Estudos da Determinação e Diferenciação do Sexo (GIEDDS) da Faculdade de Ciências Médicas e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas cujas idades variaram de 5 a 23 anos (média: 12,6 anos) (casos 1-A a 5-A). Três tinham sexo social masculino e dois feminino; um dos pacientes tinha diagnóstico prévio de DGP 46,XY e vinha apresentando déficit de crescimento durante o seguimento, o que gerou suspeita de criptomosaicismo com linhagem 45,X, e os demais tinham cariótipo 45,X/46,XY, dos quais três com DGM e um com ST (Tabela 1).

Tabela 1 – Diagnóstico clínico e constituição cromossômica dos 5 pacientes com distúrbios da diferenciação do sexo que fizeram parte da casuística deste trabalho.

Caso	Diagnóstico Clínico	Cariótipo
1-A	DGM	45,X[2]/46,XY[48]
2-A	DGP XY	46,XY[50]
3-A	DGM	45,X[34]/46,XY[16]
4-A	ST	45,X[14]/46,XY[36]
5-A	DGM	45,X/46,XY,del(Y)(q12)

DGM= disgenesia gonadal mista; DGP XY= disgenesia gonadal parcial 46,XY; ST= síndrome de Turner

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer 408/2011, Anexo 1) e os sujeitos da pesquisa ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

b) Métodos

O protocolo de investigação do grupo de homens normais iniciou-se com o estudo do cariótipo por meio de cultura de linfócitos com análise de 50 células, o que permitiu excluir um mosaicismo de 6% ou mais com 95% de confiabilidade [47]. O cariótipo normal desses indivíduos (46,XY) permitiu que fossem em seguida analisados, por meio de FISH com sondas específicas para os

cromossomos X e Y, núcleos interfásicos de linfócitos de sangue periférico e mucosa oral. Buscou-se ainda aumentar, por meio de FISH, o número de metáfases analisadas, a fim de, juntamente com as 50 metáfases obtidas pelo cariótipo convencional, aumentar ainda mais a probabilidade de que os indivíduos analisados fossem cromossomicamente normais. Os pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY também foram submetidos a FISH para análise de núcleos interfásicos de linfócitos e mucosa oral.

i. Análise citogenética por bandamento G

O exame de cariótipo foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas / Unicamp, por meio de cultura de linfócitos obtida pela técnica descrita por Moorhead *et al.* [48], com modificações.

Coleta da amostra – Após assepsia local com álcool 70%, foram coletados 5mL de sangue por meio de punção venosa com tubos de coleta a vácuo da marca BD[®] contendo heparina sódica.

Preparo da Cultura – Foram adicionados em média 0,5mL de sangue total heparinizado a frascos de cultura âmbar contendo 5mL de meio de cultura RPMI, 15% de soro fetal bovino e 0,2mL de fitohemaglutinina, todos da marca GIBCO[®]. Os frascos de cultura foram incubados a 37°C por 72 horas. Duas horas antes do fim desse período foi acrescentada uma gota (0,02mL) de brometo de etídio 1mg/mL e 30 minutos antes do término da cultura foram adicionadas duas gotas (0,04mL) de colquicina 4x10E-5M à cultura (ambos da marca SIGMA[®]). Após o final do período de incubação foi realizada a hipotonia direta utilizando-se 5mL de solução hipotônica de KCl 0,075M a 37°C por 30 minutos. Após a hipotonia foi realizada a fixação utilizando-se como fixador metanol e ácido acético (3:1) (ambos da marca MERCK[®]).

Preparação das lâminas – para a confecção das lâminas, as mesmas foram colocadas em etanol a 70% por alguns minutos, posteriormente colocadas em água deionizada e escorridas. Em seguida foram pingadas sobre as lâminas duas a três gotas do material fixado com o auxílio de pipetas Pasteur. As lâminas foram colocadas em uma estufa na temperatura de aproximadamente 55°C durante alguns minutos e foram observadas em microscópio de contraste de fase a fim de confirmar o aparecimento de metáfases.

Bandamento G – foi realizado de acordo com a técnica descrita por Sanchez *et al.* [49], com pequenas modificações. As lâminas foram deixadas em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas e em seguida incubadas em tampão fosfato 0,06M pH 6,8 em banho-maria a 37°C por um período de 15 minutos. Após a incubação, as lâminas foram coradas com solução de eosina e azul de metileno segundo Wright diluído em tampão fosfato na proporção de 1:3 por 5 minutos.

Análise Cromossômica – Foram analisadas 50 metáfases de cada indivíduo em microscópio óptico comum da *Olympus*[®] e as imagens foram capturadas utilizando o *software* FISHView da *Applied Spectral Imaging*[®]. A resolução obtida foi de 400 a 550 bandas.

Armazenamento do material – Após as análises, todos os *pellets* foram armazenados em tubos “*eppendorf*” contendo solução fixadora, à temperatura de -20°C, para a realização da FISH.

ii. *FISH (hibridação in situ com fluorescência) em linfócitos*

Para a técnica de FISH foram utilizadas sondas tipo alfa-satélite locus específica para as regiões centroméricas dos cromossomos X (DXZ1, marcada em verde) e Y (DYZ3, marcada em vermelho) (Cytocell Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

Na preparação das lâminas foram utilizadas suspensões de linfócitos de sangue periférico estocadas em solução de metanol e ácido acético (3:1) a -20°C. Antes do procedimento, as lâminas permaneceram a 65°C por 2 horas, em média. Em seguida, foram incubadas a 37°C por 40 minutos em solução de 2XSSC (pH 7,0). Na seqüência, passaram por uma série de banhos em etanol (70%, 85% e 100%), por 1 minuto em cada concentração e foram secadas naturalmente em temperatura ambiente. As lâminas foram previamente avaliadas em microscópio de fase, para seleção da área de hibridação contendo preferencialmente grande número de núcleos interfásicos.

Após essa etapa, a sonda foi aplicada na área previamente selecionada, marcada com caneta diamante. Em seguida, a área de hibridação foi coberta com uma lamínula e selada com cola especial (cola vinil da marca *Brascola*[®]). Na seqüência, as lâminas foram aquecidas a 75 °C por 7 minutos para a desnaturação dos cromossomos e do DNA da sonda. A hibridação ocorreu em caixa umedecida a 37°C por aproximadamente 16 horas. Após a hibridação, removeu-se a lamínula e iniciou-se um processo de lavagem rápida da lâmina mantendo-a em uma solução de 2x SSC/0.1% Tween 20 (pH 7,0) por 2 minutos em temperatura ambiente.

Após essa fase, a lâmina foi colocada em uma solução de 0,4xSSC/0.3% Tween 20 a 72°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) (pH 7,0) por 1 minuto, sem agitação e em seguida colocadas em uma solução de 2xSSC/0,1% Tween 20 (pH 7,0) por 1 minuto em temperatura ambiente, com leve agitação. A lâmina foi seca em temperatura ambiente, e a seguir foram aplicados sobre ela 10 μl de DAPI. A área selecionada foi coberta com lamínula (24x32) e em seguida a lâmina foi guardada em uma caixa escura por no mínimo 10 minutos antes de observar em microscópio de fluorescência. As soluções utilizadas para a realização da técnica de FISH estão no Anexo 05.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência *BX51-BF-II/BX2* da Olympus[®] com filtros de fluorescência adequados e as

imagens foram capturadas utilizando o *software FISHView* da *Applied Spectral Imaging*®.

Buscou-se analisar 1000 núcleos interfásicos de linfócitos de cada um dos homens normais e dos pacientes com DDS. Foi realizado ainda um aumento da contagem de metáfases no grupo de homens saudáveis, fazendo uso daquelas que fossem encontradas na área de hibridação.

iii. *FISH (hibridação in situ com fluorescência) em mucosa oral*

Já para a realização da FISH em mucosa oral foi utilizado o protocolo adaptado proposto por Romczak *et al.* [50]. As células da mucosa bucal foram coletadas com uma haste de madeira das laterais internas da bochecha. A amostra foi colocada imediatamente em tubo contendo solução salina estéril, o qual foi centrifugado três vezes com salina e mais três vezes com solução fixadora (3:1 de metanol e ácido acético). Após 24 horas, as amostras foram pingadas em lâminas e armazenadas em estufa 65°C por 2 horas.

As lâminas foram previamente avaliadas em microscópio de fase, para seleção da área de hibridação. Após essa etapa, foram colocadas em solução de 2xSSC a 73°C por 2 minutos, e colocadas em solução contendo pepsina (SIGMA®) 0.005% em 10 mM HCl a 37°C por 40 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes no tampão PBS 1X, deixadas em solução de PBS 1x/formol puro por 5 minutos e passadas novamente duas vezes no tampão PBS 1X.

Após essas etapas, as lâminas foram passadas em três concentrações de etanóis gelados (70%, 85% e 100%) por 1 minuto cada. Na fase de pré-desnaturação, as lâminas foram deixadas em solução de 2xSSC/formamida 70% por 2 minutos a 72°C e novamente passadas por 1 minuto em cada concentração de etanol gelado (70%, 85% e 100%). Após a secagem das lâminas, foram colocados 10µl de sonda na região selecionada e esta foi coberta com uma lamínula. Para hibridação, as lâminas foram colocadas na chapa aquecedora a

73°C por 10 minutos e logo depois foram armazenadas em caixas úmidas e escuras por aproximadamente 20 horas a 65°C.

Para a lavagem foi necessário retirar as lamínulas e deixar as lâminas na solução de 2xSSC/0,05% tween 20 a 37°C por 5 minutos, na solução 0,4xSSX/0,15% tween 20 a 73°C por 2 minutos, passá-las em seguida em 2xSSC/0,05% tween em temperatura ambiente e posteriormente em água milique. Após a secagem das lâminas, foram colocados 10µl de DAPI e as regiões selecionadas foram cobertas com lamínulas.

A análise das lâminas também foi realizada em microscópio de fluorescência *BX51-BF-II/BX2* da Olympus® com filtros de fluorescência adequados e as imagens foram capturadas utilizando o *software FISHView* da *Applied Spectral Imaging*®. A análise envolveu a contagem de 1000 núcleos dos indivíduos saudáveis e dos pacientes com 46,XY e mosaico 45,X/46,XY.

iv. *Análise estatística*

Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados por meio do programa computacional SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados, a comparação das medidas numéricas entre indivíduos normais e pacientes com DDS foi feito por meio do teste de Mann-Whitney e a comparação dos resultados obtidos na análise dos dois tipos de células foi feita por meio do teste de Wilcoxon para amostras relacionadas. Para verificar associação linear entre parâmetros de interesse foi utilizado o coeficiente de correlação linear de Spearman. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5%.

5. Resultados

a. *Cariótipo*

O protocolo de investigação iniciou-se com o estudo do cariótipo por meio de cultura de linfócitos com análise de 50 células no grupo de homens saudáveis. Todos apresentaram resultado normal (46,XY) nas 50 células analisadas.

b. *Análise por FISH no grupo de homens normais*

i. *Ampliação da análise de metáfases de linfócitos de sangue periférico*

A análise adicional de metáfases de linfócitos de sangue periférico que se encontravam na área de hibridação (de sete a 180, em média 75) permitiu aumentar o grau de confiabilidade na exclusão de mosaicismo nessa amostra (Tabela 2). Somando a análise por FISH àquela realizada por meio do cariótipo convencional, somente dois indivíduos (casos 11 e 13) tiveram metáfases 45,X detectadas (2/155 e 1/131, respectivamente). Considerando que foram encontradas menos de 2% de células com essa anormalidade, os dois indivíduos não foram excluídos da amostra.

Tabela 2 – Ampliação da análise de metáfases obtidas de linfócitos de sangue periférico de homens saudáveis por meio de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y.

Caso	45,X	46,XY	Total	Total incluindo as 50 metáfases do cariótipo convencional
-------------	-------------	--------------	--------------	--

1	0	7	7	57
2	0	180	180	230
3	0	47	47	97
4	0	161	161	211
5	0	65	65	115
6	0	121	121	171
7	0	32	32	82
8	0	28	28	78
9	0	77	77	127
10	0	28	28	78
11	2	103	105	155
12	0	49	49	99
13	1	80	81	131
14	0	43	43	93
15	0	14	14	64
16	0	37	37	87
17	0	72	72	122
18	0	156	156	206
19	0	134	134	184

ii. *Análise de núcleos interfásicos no grupo de homens normais*

Os achados referentes à análise de núcleos interfásicos de linfócitos e mucosa oral dos homens saudáveis encontram-se na Tabela 3. Em ambos os tecidos, o teste de Shapiro-Wilk revelou que essa variável tinha distribuição normal ($p=0,105$ e $p=0,082$, respectivamente). A proporção de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X variou de zero a 14:1.000 em linfócitos de sangue periférico (média: 4,6; desvio-padrão: 3,7) e de zero a 13:1.000 em células de mucosa oral (média: 5,2; desvio-padrão: 4,0). Assim, o achado de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X em número superior a 12:1.000 em linfócitos e 13:1.000 em células de mucosa oral (média mais dois desvios-padrão) deve ser considerado indicativo de mosaicismo em nosso laboratório, uma vez que só 2,5% dos indivíduos normais terão números superiores a estes. Esse diagnóstico poderá ser feito com um grau de segurança ainda maior se forem encontrados números superiores a 16:1.000 em linfócitos e 17:1.000 em células de mucosa oral (média mais três desvios-padrão).

A comparação da frequência de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X nos linfócitos e células de mucosa oral desses indivíduos não mostrou diferença significativa ($p=0,6855$). Foi observada correlação negativa significativa entre a idade dos indivíduos e a frequência de núcleos contendo somente o sinal de X em células de mucosa oral ($\rho=-0,47331$; $p=0,0407$), mas não em linfócitos ($\rho=-0,01647$; $p=0,9466$).

Tabela 3 – Análise de núcleos interfásicos de linfócitos de sangue periférico e mucosa oral de homens saudáveis por meio de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y.

	Linfócitos			Mucosa oral		
	1 sinal de X	1 sinal de X e 1 de Y	Total	1 sinal de X	1 sinal de X e 1 de Y	total

1	10	990	1000	14	986	1000
2	3	997	1000	3	997	1000
3	7	993	1000	6	994	1000
4	1	999	1000	10	990	1000
5	3	997	1000	5	995	1000
6	2	998	1000	4	996	1000
7	6	994	1000	0	1000	1000
8	10	990	1000	8	992	1000
9	4	996	1000	3	997	1000
10	5	995	1000	2	998	1000
11	0	1000	1000	8	992	1000
12	0	1000	1000	2	998	1000
13	1	999	1000	0	1000	1000
14	3	997	1000	3	997	1000
15	14	986	1000	7	993	1000
16	7	993	1000	13	987	1000
17	5	995	1000	4	996	1000
18	3	997	1000	4	996	1000
19	4	996	1000	2	998	1000

c. Análise de núcleos interfásicos no grupo de pacientes com DDS

Os achados referentes à análise de núcleos interfásicos de linfócitos e mucosa oral dos pacientes com DDS encontram-se na Tabela 4. Apenas no caso da paciente 4-A não foi possível contar os 1000 núcleos previstos por haver material insuficiente. Foram detectados núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X tanto nos quatro casos em que o mosaicismo já havia sido observado no cariótipo convencional quanto no caso 2-A, cujo cariótipo era 46,XY em 50 células. Nesse caso, a confirmação da presença da linhagem 45,X foi feita por meio do estudo de 144 metáfases também por FISH, sendo encontradas 15 células 45,X (10,4%).

A proporção de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X variou de 76:1.000 a 430:1.000 em linfócitos de sangue periférico (média: 266,8; desvio-padrão: 130,7) e de 234 a 430:1.000 em células de mucosa oral (média: 348,8; desvio-padrão: 76,1). A frequência de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X diferiu significativamente da observada em indivíduos normais tanto em linfócitos ($p=0,0008$) quanto em células de mucosa oral ($p=0,0008$).

No caso 5-A houve ainda outros achados além da presença de um sinal de X ou um sinal de X e um de Y, indicando a existência de outras linhagens celulares além daquelas detectadas no cariótipo convencional (45,X e 46,XY,del(Y)(q12)).

A comparação da frequência de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X nos linfócitos e células de mucosa oral desses pacientes não mostrou diferença significativa ($p=0,3750$). Foi observada correlação negativa significativa entre a idade dos indivíduos e a frequência de núcleos contendo somente o sinal de X em linfócitos ($\rho=-0,90000$; $p=0,0374$), mas não em células de mucosa oral ($\rho=-0,20000$; $p=0,7471$).

Tabela 4 – Análise de núcleos interfásicos de linfócitos de sangue periférico e mucosa oral de pacientes com DDS por meio de FISH com sondas específicas para os cromossomos X e Y.

Caso	Linfócitos				Mucosa oral			
	1 sinal de X	1 sinal de X e 1 de Y	Outros*	Total	1 sinal de X	1 sinal de X e 1 de Y	Outros*	Total
1-A	76	924	0	1000	355	645	0	1000
2-A	233	767	0	1000	234	766	0	1000
3-A	430	570	0	1000	430	570	0	1000
4-A	331	669	0	1000	324	535	0	859**
5-A	267	557	176	1000	401	519	80	1000

*Núcleos apresentando 1 sinal de X e 2 sinais de Y muito próximos; núcleos com 1 sinal de X e 2 sinais separados de Y; e núcleos com 1 sinal de X e 4 sinais de Y.

**Material insuficiente para a contagem de 1000 núcleos.

6. Discussão

Em pacientes com ST, como já foi visto, a perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual associa-se com frequência significativa a diversas anomalias congênitas e afecções adquiridas ao longo da vida. Assim, uma vez firmado esse diagnóstico, o protocolo de investigação de anomalias congênitas associadas inclui avaliação cardiovascular (com eletrocardiograma e ecocardiograma, além de ressonância magnética em determinados casos), ultrassonografia renal, audiometria, exame oftalmológico, avaliação da função tireoideana, avaliação ortodôntica e densitometria óssea, entre outros exames [15].

O seguimento de casos de ST inclui avaliação cardiovascular e audiológica e *screening* para doença celíaca periódicos (a cada cinco anos, por exemplo), além de investigação no mínimo anual da função tireoideana, da função hepática, da tolerância a carboidratos e da presença de dislipidemias. Além disso, em crianças e pré-adolescentes, a terapia de promoção do crescimento com GH (hormônio de crescimento) permite aumento da estatura final, que é tanto maior quanto mais cedo for iniciada a terapia [15].

Os resultados deste trabalho indicam que, nas condições técnicas existentes em nosso laboratório, o achado de núcleos interfásicos contendo, na hibridação *in situ*, apenas o sinal do X em número superior a 12:1.000 em linfócitos ou a 13:1.000 em mucosa oral são indicativos da presença de mosaicismos com linhagem 45,X. Além disso, a observação de que a frequência de núcleos contendo apenas o sinal do cromossomo X em linfócitos não difere daquela encontrada em mucosa oral permite que em indivíduos com DDS ou esterilidade e cariótipo 46,XY a pesquisa de mosaicismos com linhagem 45,X possa ser feita por meio de FISH diretamente em núcleos de mucosa oral. É possível, assim, aumentar significativamente o número de células analisadas ao mesmo tempo em que se investiga a presença de mosaicismos em tecido de outra origem embrionária e sem necessidade de nova cultura de linfócitos.

Ao avaliar um indivíduo com ambiguidade genital, o cariótipo é o ponto de partida da investigação. Indivíduos com anomalias numéricas ou estruturais de

cromossomos sexuais ou quimerismo (46,XX/46,XY) podem apresentar diferentes quadros de distúrbios da diferenciação gonadal (DDG), incluindo DGM e hermafroditismo. O cariótipo 46,XX também pode estar associado a um DDG (hermafroditismo ou homem 46,XX), mas frequentemente indica que a ambiguidade genital é decorrente de excesso de andrógenos fetais (particularmente hiperplasia adrenal congênita), fetoplacentários ou maternos. Finalmente, um resultado de cariótipo 46,XY também pode se associar a um DDG (disgenesia gonadal parcial e hermafroditismo, entre outros), mas mais frequentemente está presente em indivíduos cuja ambiguidade genital é decorrente de anomalias na produção ou ação de hormônios testiculares [52].

A partir do resultado do cariótipo, exames hormonais, histopatológicos, moleculares e de imagem são utilizados para dar prosseguimento à investigação e chegar ao diagnóstico etiológico [53]. Assim, no momento em que é solicitado o exame de cariótipo os elementos existentes para o estabelecimento da hipótese diagnóstica são ainda escassos (somente história clínica e exame físico, na maioria das vezes) e não é possível prever se haverá necessidade de pesquisar mosaicismos por FISH.

Em homens com genitais masculinos típicos cuja queixa é esterilidade, o exame de cariótipo busca detectar não só a síndrome de Klinefelter (47,XXY) mas também anomalias estruturais do cromossomo Y ou mesmo anomalias autossômicas aparentemente equilibradas. Revisões recentes sobre o assunto não chegam a mencionar o cariótipo 45,X/46,XY como um dos possíveis achados [54], embora, como já foi visto, essa constituição cromossômica possa ser encontrada nesses casos [39; 40]. Assim, no momento da solicitação do exame de cariótipo raramente essa é uma hipótese que já esteja sendo considerada, e também raramente está prevista a necessidade de pesquisar mosaicismos por FISH.

Portanto, não raro a necessidade de buscar mosaicismos com linhagem 45,X em um indivíduo com DDS ou esterilidade e cariótipo 46,XY surge num momento em que não é mais possível utilizar, para FISH, material da cultura de

linfócitos a partir da qual foi analisado o cariótipo. Nesses indivíduos, a análise de núcleos interfásicos de mucosa oral poderia ser usada como rotina.

Nos casos em que a análise de 1.000 núcleos de células desse tecido indicar a presença de linhagem 45,X por meio de 13 ou mais núcleos contendo apenas o sinal do X, é necessário buscar confirmação por meio de FISH em metáfases de linfócitos. De todo modo, esse achado inicial pode já justificar a investigação de anomalias congênitas associadas à linhagem 45,X, bem como o seguimento desses indivíduos como preconizado para a ST, particularmente quando o número de núcleos com resultado anômalo for superior a 17:1.000. Perante valores entre 13 e 17:1.000, a pertinência de dar início à investigação de anomalias congênitas e ao seguimento deve ser avaliada caso a caso, considerando o quadro clínico como um todo, incluindo dados antropométricos, exame dismorfológico e características genitais e de função gonadal.

Ao aplicar a técnica de FISH a linfócitos e células de mucosa oral do paciente 2-A, com diagnóstico prévio de disgenesia gonadal parcial 46,XY, foi possível chegar ao diagnóstico correto nesse caso, que é o de DGM - como já foi visto, em ambas as condições há disgenesia testicular parcial e ambiguidade genital. Uma vez confirmado esse diagnóstico, a criança pôde ser submetida a todos os exames necessários para detectar outras anomalias congênitas, passou a ser seguida nos moldes preconizados para a ST e também a receber GH, uma vez que já se comprovou o benefício do uso desse hormônio na melhora da altura final também em indivíduos com DGM [55].

O paciente 2-A, criado no sexo masculino, deverá ter seu desenvolvimento puberal futuro acompanhado cuidadosamente. Isso porque embora seja possível que a presença de ao menos um testículo em um indivíduo com DGM permita o desenvolvimento de caracteres puberais espontâneos, pode haver falência secundária das células de Leydig que requeira terapia de reposição com testosterona [55].

Nos cinco pacientes com DDS, o número de células com apenas o sinal do X nos dois tecidos analisados foi muito superior ao limite calculado a partir do estudo dos jovens normais. Esse fato foi observado até mesmo no indivíduo 2-A, que tinha cariótipo de rotina normal em 50 células. Esse caso pode ser considerado modelo de situação em que o FISH, mesmo que realizado apenas em células de mucosa oral, poderia ser utilizado como exame de rotina para a elucidação do diagnóstico etiológico em casos de DDS 46,XY. Nesses cinco indivíduos também não houve diferença significativa entre os dois tecidos na proporção de núcleos contendo apenas o sinal do X, confirmando que o FISH somente de mucosa oral poderia ser utilizado na rotina.

No caso 5-A, no qual já eram conhecidas duas linhagens pelo cariótipo convencional, uma monossômica e outra com deleção do braço longo do cromossomo Y, achados adicionais em proporção significativa dos núcleos nos dois tecidos indicaram a existência de linhagens adicionais. Entre elas deve haver ao menos uma linhagem 47,XYY e uma 49,XYYYY, resultantes de falta de disjunção do Y estruturalmente anômalo na mitose.

Finalmente, é difícil interpretar os achados de correlação negativa entre a idade dos jovens saudáveis que compuseram a amostra deste trabalho e a frequência de núcleos de mucosa oral contendo apenas o sinal do X, e de correlação também negativa entre a idade dos indivíduos com DDS e a frequência de núcleos de linfócitos com essa mesma característica. De todo modo, os dois grupos de indivíduos diferem em relação ao fato de que, entre jovens normais, a perda do cromossomo Y na divisão celular deve ocorrer de forma casual, enquanto que em indivíduos com mosaicismos pode haver mudanças na proporção de diferentes linhagens celulares em mosaico ao longo do tempo [56; 57].

Os resultados deste trabalho indicam, portanto, que a pesquisa de mosaicismos com linhagem 45,X em indivíduos com DDS ou esterilidade e cariótipo 46,XY pode ser feita por meio de FISH em células de mucosa oral. Esse exame torna desnecessária a realização de cultura de linfócitos para essa investigação (embora esta deva ser realizada buscando confirmar os casos positivos) e pode

também substituir a cultura de fibroblastos por biópsia de pele como meio de avaliar a constituição cromossômica em tecido de origem embrionária diversa do sangue periférico. Seu emprego tem, portanto, vantagens evidentes em termos de custo e rapidez, além de não ser invasivo.

7. Conclusões

- Nas condições técnicas existentes em nosso laboratório, a presença de apenas o sinal do X na FISH em número superior a 12:1.000 em linfócitos ou a 13:1.000 em mucosa oral são indicativos da presença de mosaicismo com linhagem 45,X.
- Não há diferença significativa na frequência de núcleos contendo apenas o sinal do X entre linfócitos e de mucosa oral de jovens saudáveis.
- Em indivíduos com DDS e cariótipo 45,X/46,XY conhecido ou suspeitado, o uso da FISH revela núcleos contendo apenas o sinal do X em número significativamente maior que o de jovens normais, também sem diferença entre os dois tecidos analisados.
- Em indivíduos com DDS ou esterilidade e cariótipo 46,XY, a investigação de mosaicismo com linhagem 45,X pode ser feita por meio de FISH diretamente em núcleos de mucosa oral.

8. Referências Bibliográficas

1. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ. Genética médica. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
2. Beiguelman B. Citogenética humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
3. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Distúrbios dos autossomos e dos cromossomos sexuais. In: Thompson & Thompson Genética Médica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.p.89-116.
4. Cheung S.W, Shaw CA, Scott DA, Patel A, Sahoo T, Bacino CA et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. Am J Med Genet A. 2007;143A(15):1679-86.
5. Gardner RJM. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling. New York, Oxford: Oxford University Press; 1989.
6. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA. 1969;64:600.
7. Guerra M. FISH – Conceito e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 2004.184p.
8. Rogatto SR. Citogenética sem risco: biossegurança e garantia de qualidade. Ribeirão Preto: FUNPEC; 2000.
9. Kearney L. Molecular cytogenetics. Best Pract Res Clin Haematol. 2001;14:645-68.
10. Fagerstrom C, Himes P, Olson S. Sex chromosome problems discovery through prenatal diagnosis: 47,XYY syndrome. The Pacific Northwest, Regional Genetics Group, 1999. Disponível em <http://here.doh.wa.gov/materials/sex-chromosome-problems-discovered-through-prenatal-diagnosis-47xyy-syndrome/>
11. Kelly TE, Franko JB, Rogol A, Golden WL. Discordant phenotypes and 45,X/46,X,idic(Y). J Med Genet. 1998;35:862–4.

12. Reddy KS, Sulcova V. Pathogenetics of 45,X/46,XY gonadal mosaicism. *Cytog Cell Genet.* 1998;82:52–7.
13. Turner HH. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck and cubitus valgus. *Endocrinology.* 1938;23:566-74.
14. Ford CE, Jones KW, Polani PE, Almeida JC de, Briggs JH. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet.* 1959;1:711-3.
15. Bondy CA, Turner Syndrome Study Group: Care of girls and women with Turner syndrome: A guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:10-25.
16. Barros BA, Maciel-Guerra AT, De Mello MP, Coeli FB, Carvalho AB, Viguetti-Campos N et al. The inclusion of new techniques of chromosome analysis has improved the cytogenetic profile of Turner syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53:1137-42.
17. Hook EB, Warburton D. The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner syndrome: Livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural X abnormalities or mosaicism. *Hum Genet.* 1983;64:24-7.
18. Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J et al. Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet.* 1995;48:6-11.
19. Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G. Ambiguidade genital. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Ed). *Menino ou menina: distúrbios da diferenciação do sexo.* Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
20. Lippe B. Turner syndrome. In: Sperling MA (Ed): *Pediatric Endocrinology.* Filadélfia: W.B. Saunders Company; 1996. p.387-422.

21. Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. *Nat Genet.* 1997;16:54-63.
22. Lemos-Marini SH, Morcillo AM, Baptista MT, Guerra-Jr G, Maciel-Guerra AT. Spontaneous final height in Turner's syndrome in Brazil. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2007;20:1207-14.
23. Carvalho AB, Guerra-Júnior G, Baptista MTM, Marques-de-Faria AP, Lemos-Marini SHV, Maciel-Guerra AT. Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56:655-9.
24. Medeiros CC, Marini SH, Baptista MT, Guerra G Jr, Maciel-Guerra AT. Turner's syndrome and thyroid disease: a transverse study of pediatric patients in Brazil. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13:357-62.
25. Maciel-Guerra, AT. Síndrome de Turner. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Ed). *Menino ou menina: distúrbios da diferenciação do sexo.* Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
26. Hjerrild BE, Mortensen KH, Gravholt CH. Turner syndrome and clinical treatment. *Br Med Bull.* 2008;86:77-93.
27. Price DA, Albertsson-Wikland K. Demography, auxology and response to recombinant human growth hormone treatment in girls with Turner's syndrome in the Kabi Pharmacia International growth study. *Acta Paediatr.* 1993;391:69-74.
28. Suzigan LZ, Silva RB, Maciel-Guerra AT. Aspectos psicossociais da síndrome de Turner. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49:157-64.
29. Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev.* 2006;27:468–84.

30. Zhong Q, Layman LC. Genetic considerations in the patient with Turner syndrome-45,X with or without mosaicism. *Fertil Steril*. 2012;98(4):775-9.
31. Wiktor AE, van Dyke DL. Detection of low level sex chromosome mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. *Am J Med Genet A*. 2005;138A:259–61.
32. Barros BA, Moraes SG, Coeli FB, Assumpção JG, De Mello MP, Maciel-Guerra AT et al. OCT4 immunohistochemistry may be necessary to identify the real risk of gonadal tumors in patients with Turner syndrome and Y chromosome sequences. *Hum Reprod*. 2011;26(12):3450-5.
33. Sohval AR. Mixed gonadal dysgenesis: A variety of hermaphroditism. *Am J Hum Genet*. 1963;15:155-8.
34. Marques-de-Faria AP. Disgenesia gonadal mista. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Ed). *Menino ou menina: distúrbios da diferenciação do sexo*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
35. Maciel-Guerra AT. DDS ovário-testicular – Hermafroditismo verdadeiro. In: Maciel-Guerra AT, Guerra-Júnior G (Ed). *Menino ou menina: distúrbios da diferenciação do sexo*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010.
36. Telvi L, Lebbar A, Del Pino O, Barbet JP, Chaussain JL. 45,X/46,XY mosaicism: report of 27 cases. *Pediatrics*. 1999;104(2 Pt 1):304-8.
37. Hsu LY. Prenatal diagnosis of 45,X/46,XY mosaicism - a review and update. *Prenat Diagn*. 1989;9(1):31-48.
38. Chang HJ, Clark RD, Bachman H. The phenotype of 45,X/46,XY mosaicism: an analysis of 92 prenatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet*. 1990;46(1):156-67.
39. Siffroi JP, Bourhis CL, Krausz C, Barboux S, Quintana-Murci L, Kanafoni S et al. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod*. 2000;15(12):2559-62.

40. Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C et al. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. *Am J Med Genet.* 2005;135:145-9.
41. Andrade JG, Guerra-Júnior G, Maciel-Guerra AT. 46,XY and 45,X/46,XY testicular dysgenesis: similar gonadal and genital phenotype, different prognosis. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010;54:331-4.
42. Gourlay WA, Johnson HW, Pantzar JT, McGillivray B, Crawford R, Nielsen WR. Gonadal tumors in disorders of sexual differentiation. *Urology.* 1994;43:537-40.
43. Simpson JL. Dysgenesis gonadal type XY. In: Buyse ML (Ed). *Birth defects.* Cambridge:Blackwell Scientific Publications;1990.p.806-7.
44. Lipay MVN, Bianco B, Verreschi IT. Disgenesias gonadais e tumores: aspectos genéticos e clínicos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(1):60-70.
45. Maciel-Guerra AT, De Paulo J, Santos AP, Guaragna-Filho G, Andrade JGR, Siviero-Miachon AA et al. The use of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of hidden mosaicism: a propos of three cases of sex chromosome anomalies. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):545-51.
46. Nazarenko SA, Timoshevsky VA, Sukhanova NN. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. *Clin Genet.* 1999;56:59-65.
47. Hook EB. Exclusion of chromosome mosaicism: tables of 90 percent, 95 percent and 99 percent confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet.* 1977;29:94-7.
48. Oliveira RMR, Verreschi IT, Lipay MV, Eça LP, Guedes AD, Bianco B. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *São Paulo Med J.* 2009;127(6):373-8.

49. Moorhead MN, Nowel PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960;20:613-6.
50. Sanchez O, Escobar JJ, Yunis JJ. A simple G-banding technique. *Lancet.* 1973; 2(7823):269.
51. Romczak EZ, Punnett HH. An improved method for chromosome enumeration using fluorescent in situ hybridization of buccal epithelium. *J Ass Genet Tech.* 1998;24:6-7.
52. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA: International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Pediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics.* 2006;118:488-500.
53. Guerra-Junior G, Maciel-Guerra AT. The role of the pediatrician in the management of children with genital ambiguity. *J Pediatr (Rio J).* 2007;83:S184-91.
54. McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical Review: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1013-24.
55. Johansen ML, Hagen CP, Rajpert-De Meyts E, Kjærgaard S, Petersen BL, Skakkebaek NE et al. 45,X/46,XY mosaicism: phenotypic characteristics, growth, and reproductive function - a retrospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; doi:10.1210/jc.2012-1388.
56. McCorquodall MM, Bowdle FC. Two pregnancies and the loss of the 46,XX cell line in a 45,X/46,XX Turner mosaic patient. *Fertil Steril.* 1985;43:229-33.

9. Anexos

a) Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 15/06/11
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 408/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0351.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS 45,X POR MEIO DE FISH EM LINFÓCITOS E MUCOSA ORAL DE HOMENS NORMAIS E SUA APLICAÇÃO A MOSAICOS 45,X/46,XY".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Juliana de Paulo

INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/05/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/06/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Buscar um exame citogenético que permita a investigação da presença de um criptomosaicismo da linhagem 45,X em indivíduos com cariótipo 46,XY por meio de uma técnica não invasiva, mais simples, rápida e de menor custo (células da mucosa oral).

III – SUMÁRIO.

Trata-se de um projeto de mestrado. Quadros de ambigüidade genital e esterilidade com cariótipo 46,XY pode ser decorrentes de mosaicismo com linhagem 45,X não detectável pelas técnicas convencionais a partir de linfócitos de sangue periférico. Estes sujeitos deixam então de ser investigados em relação a uma série de problemas clínicos, com anomalias cardiovasculares e renais, e deixam de receber seguimento clínico. Casuística 30 homens saudáveis entre 20 e 30 anos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

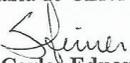
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 26/06/12
(PARECER CEP: N° 408/2011)

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INVESTIGAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE NÚCLEOS 45,X POR MEIO DE FISH EM LINFÓCITOS E MUCOSA ORAL DE HOMENS NORMAIS E SUA APLICAÇÃO A MOSAICOS 45,X/46,XY”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Juliana de Paulo

II – PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP aprovou o Relatório Parcial, apresentado em junho de 2012, do protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de junho de 2012.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

b) Anexo 02. Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA

Investigação da frequência de núcleos 45,X por meio de FISH em linfócitos e mucosa oral de homens normais e sua aplicação a mosaicos 45,X/46,XY

Responsáveis: Juliana de Paulo (Mestranda) e Profa. Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra (orientadora).

Nome:

—

Registro Hospitalar: _____ RG: _____

Endereço:

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Fone: () _____

Acompanhante: _____

Grau _____ de
parentesco: _____ Idade: _____ RG: _____

Justificativa e objetivos do trabalho

Quadros de ambiguidade genital e esterilidade com cariótipo masculino normal (46,XY) podem ser devidos à presença de uma linhagem com anomalia cromossômica (45,X) não detectável pelos exames de rotina em sangue. Quando essa linhagem anormal não é detectada, esses indivíduos deixam de ser avaliados e tratados adequadamente. O objetivo deste trabalho é buscar um exame que permita a detecção dessa linhagem 45,X em um outro tecido (mucosa oral) por meio de técnica não invasiva, mais simples, rápida, e de menor custo. Para isso, utilizaremos a técnica de FISH, que é o aprofundamento do estudo cromossômico, para comparar os resultados encontrados em sangue e mucosa oral de homens da população geral. Caso o exame da mucosa oral se mostre eficaz, esses mesmos testes serão realizados em pessoas com cariótipo 45,X/46,XY previamente conhecido.

Procedimento, riscos e desconfortos

Nos voluntários da população geral, será realizada coleta de sangue para exame do cariótipo (análise dos cromossomos) e para estudo por FISH, e coleta de mucosa oral também para o estudo por FISH. Nos indivíduos com

cariótipo 45,X/46,XY já conhecido, será realizado FISH a partir da coleta de sangue e mucosa oral.

A coleta da amostra de sangue será feita a partir de punção de veia periférica, por profissional habilitado (médico, enfermeira ou biomédico). Os desconfortos possíveis são dor, inchaço e pequenos hematomas na região, que desaparecem em poucos dias. A coleta de mucosa oral será feita raspando com suavidade a parte interna das bochechas com uma espátula, e não traz qualquer desconforto.

Vantagens

Os voluntários da população geral terão conhecimento sobre sua constituição cromossômica, ao receber o laudo do exame de cariótipo realizado por nosso laboratório. Quanto aos portadores de mosaicismo, o estudo permitirá estabelecer melhor a proporção de células normais (46,XY) e monossômicas (45,X) no organismo.

Sigilo

As informações sobre o resultado dos exames serão fornecidas diretamente aos voluntários e, no caso dos pacientes com mosaicismo, durante a consulta médica; se utilizadas em congressos ou publicações médicas, serão excluídos os nomes dos pacientes.

Fornecimento de informação adicional

Garantimos aos participantes resposta a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida sobre os assuntos relacionados à pesquisa, sendo fornecidas, ainda, informações atualizadas durante o estudo. Maiores esclarecimentos podem ser fornecidos por:

Dra. Andréa Trevas Maciel Guerra – tel: (19) 3521-8909

Mestranda Juliana de Paulo (responsável pelo contato com os pacientes) – tel: (19) 3521- 8909

Comitê de Ética em Pesquisa – Unicamp – (19) 3521-8936

Recusa ou descontinuação da participação

A participação neste estudo é livre, podendo o participante recusá-la a qualquer momento, sem que haja comprometimento do atendimento médico que recebe ou receberá no Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

A participação na pesquisa é de forma voluntária, ou seja, sem remuneração financeira e sem ressarcimento, pois não existirão gastos por parte dos participantes.

Local: _____ Data: _____

Ambulatório: _____

Assinatura do Participante ou Acompanhante:

Pesquisador responsável pela transmissão das informações

c) Anexo 03. Ficha de coleta de dados do grupo controle

Ficha de coleta de dados – Controles

Nome:

Data de nascimento ___/___/___ Idade:_____ Natural de:

Contato (telefone, endereço e email):_____

Desejo receber o resultado por:

() endereço () email () outros_____

Algumas perguntas sobre a sua saúde:

1) Quando você nasceu, os testículos estavam “presos”, teve necessidade de fazer algum tratamento (com remédio ou cirurgia) para “descer”?

() não () sim.

Qual? _____

2) Quando você nasceu, o médico descobriu hipospádia (abertura do canal da urina fora da ponta do pênis)?

() não () sim .

Qual? _____

3) Você nasceu com algum problema de coração?

() não () sim .

Qual? _____

4) Tem algum problema de coração atualmente?

() não () sim .

Qual? _____

5) Você nasceu com algum problema renal?

() não () sim .

Qual? _____

6) Tem algum problema renal atualmente?

() não () sim .

Qual? _____

7) Fez alguma cirurgia na infância?

() não () sim .

Qual? _____

8) Teve ou tem problema de Tireóide?

() não () sim .

Qual? _____

9) Com quantos anos começaram a surgir os primeiros pêlos (puberdade)?

10) Sua puberdade foi normal ou precisou usar algum remédio (hormônio)?

() normal () uso de remédio: sim .

Qual remédio? _____

11) Qual sua altura atual? _____

12) Altura do pai: _____ (é mais alto que você? [] não [] sim)

13) Altura da mãe: _____ (é mais alta que você? [] não [] sim)

14) Está fazendo uso atualmente de alguma medicação?

() não () sim .

Qual? _____

d) Anexo 04. Protocolo de Cariótipo de sangue periférico por banda G

Composição das soluções necessárias:

Brometo de etídio 1mg/ml

Pesar de 0,001 a 0,005 g e diluir na proporção de 1mg/1ml em água de injeção, solução fisiológica estéril ou meio RPMI.

Colchicina $4 \times 10^{-5}M$

Solução mãe: pesar 0,004 g de colchicina e diluir em 10ml de solução salina 0,9% estéril. Manter congelada.

Solução de uso (1:50): diluir 1ml da solução mãe em 49ml de solução salina 0,9% estéril.

Cloreto de potássio (KCl) 0,075M.

Pesar 1,398g de KCl e dissolver em 250ml de água deionizada.

HCl 37% a 1N – 100 mL

Diluir 8,28 mL em 100 mL de água deionizada. Essa solução precisa ser autoclavada.

Solução fixadora

Metanol (3): Ácido acético (1)

Protocolo:

Coletar de 2 a 5ml de sangue através de punção venosa com seringa previamente heparinizada (0,2 – 0,4 ml de heparina sódica), ou em tubos de coleta a vácuo contendo heparina sódica (tubos com tampa verde), após assepsia local com álcool 70%. Também pode ser utilizado tubo com citrato de sódio para a coleta.

Limpar o fluxo com álcool 70%, colocar todos os materiais necessários (conforme número de amostras), ligar o fluxo, a luz UV do mesmo e a luz UV da câmara asséptica por 15 – 20 minutos.

Para preparação do meio de cultura adicionar, em um frasco de 50 ou 100 ml – 80% a 90% do meio de cultura RPMI-1640; 10% a 20% de soro fetal bovino; adicionar 0,2ml de fitohemaglutinina e ajustar o pH para 6,8 – 7,1 adicionando HCl 1M.

Distribuir 5 ml do meio em cada frasco âmbar de 15 ml e adicionar de 0,5ml a 1ml de sangue total heparinizado e tampar com rolhas de silicone.

Incubar os frascos de cultura a 37°C por 72 horas. Entre 1,5h a 2h antes do término das 72 horas, adicionar 0,02ml (1 gotas) de brometo de etídio 1mg/ml e 40 minutos antes do término das 72 horas 0,04ml (2 gotas) de colchicina 4x10E-5M à cultura de linfócitos.

Hipotonia Direta: Após retirar os tubos de cultura da estufa, centrifugar a 1.700 rpm por 5 minutos e retirar o sobrenadante. Ressuspender no vórtex (por aproximadamente 10 segundos), adicionar 6 ml de KCl 0,075M a 37°C, ressuspender novamente no vórtex (por aproximadamente 10 segundos) e colocar em incubadora a 37°C por 30 minutos.

Interromper a hipotonia adicionando 0,5ml de solução fixadora (metanol 3:1 ácido acético), ressuspender no vórtex até que todo o material esteja com a coloração homogênea e centrifugar a 1700 rpm por 5 minutos. Retirar o

sobrenadante, deixando apenas 1 ml no tubo, adicionar 4 ml de solução fixadora, ressuspender e centrifugar novamente por 1700 rpm durante 5 minutos. Repetir o passo anterior por mais 3 vezes, ou até o *pellet* “ficar limpo” (incolor). Colocar os tubos no freezer por no mínimo 1 hora ou, preferencialmente, deixar por 24 horas.

Deixar as lâminas em uma cuba com álcool 70% por alguns minutos. Após esse período, enxugar as lâminas com papel macio, identificar e colocar em uma cuba com água deionizada. Retirar o material do freezer, centrifugar, retirar o sobrenadante e adicionar 4 ml de “fixador novo”, centrifugar novamente e retirar o sobrenadante deixando apenas 1 ml ou menos do material. Pingar de três a quatro gotas do material, com pipetas Pasteur, sobre as lâminas molhadas. Colocar as lâminas em uma estufa a 50°C - 56°C, durante alguns minutos e observar em microscópio óptico comum com o diafragma fechado, ou em microscópio de fase.

e) Anexo 05. Protocolo da FISH em sangue periférico

Composição das soluções necessárias para realização da FISH em mucosa oral:

Solução 20x SSC pH 5,3 – Solução mãe

87,67g NaCl

44,12g citrato de sódio

Dissolver o NaCl e o citrato de sódio em 400mL de água destilada, ajustar o pH com HCL 1M e depois colocar 100mL de água destilada (volume final de 500mL) ajustando o pH novamente para 5,3, filtrar e conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

Solução 2xSSC

10mL 20xSSC

90mL água destilada estéril

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M. Conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

Etanol 70%

35 mL etanol 100%

15 mL água destilada estéril

Etanol 85%

42,5 mL etanol 100%

7,5 mL água destilada estéril

Etanol 100%

40mL etanol 100%

Solução 2x SSC/ 0,1 % Tween 20

90mL de água destilada

10mL de 20Xssc

100 µl Tween 20

Solução 0,4XSSC/0,3% Tween 20

2mL de 20x SSC

300 µl de Tween 20

Água destilada para completar 100mL

Protocolo:

a) Preparação e pré-tratamento das lâminas:

1. Pingar o material em lâminas limpas em álcool;
2. Deixar a lâmina envelhecer por uma noite em temperatura ambiente ou em estufa a 37°C;
3. Observar a lâmina no microscópio de contraste de fase e marcar com caneta diamante a área da lâmina onde deverá ser aplicada a sonda;
4. Colocar as lâminas em uma solução de 2x SSC (pH 7,0) a 37° C (+/- 1°C) durante 60 minutos*;
5. Desidratar as lâminas em uma série de etanóis a 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada;
6. Deixar as lâminas secarem naturalmente.

* O tempo em que a lâmina permanece nessa solução é inversamente proporcional à idade da lâmina.

b) Co-denaturação:

1. Deixar a sonda em temperatura ambiente por alguns minutos;
2. Ressuspender a sonda no *vórtex* e dar um *spin* antes de pipetá-la*;
3. Aplicar 10 µl da sonda sobre a área previamente selecionada da lâmina;
4. Cobrir com uma lamínula de 22x22mm;
5. Selar a lamínula com cola especial;

6. Colocar as lâminas em uma placa aquecida a 75°C (+/- 1°C) e deixar durante 7 minutos.

c) Hibridação:

1. Colocar as lâminas em uma caixa úmida;
2. Colocar em estufa a 37°C (+/- 1°C) por uma noite (de 12 a 16 horas).

d) Pós-hibridação:

1. Remover a lamínula e toda a cola, cuidadosamente;
2. Colocar as lâminas em uma solução de 2x SSC/0.1% Tween 20 (pH 7,0) por 2 minutos em temperatura ambiente;
3. Colocar as lâminas em uma solução de 0,4xSSC/0.3% Tween 20 a 72°C (+/-1°C) (pH 7,0) por 1 minuto, sem agitação;
4. Colocar as lâminas em uma solução de 2xSSC/0,1% Tween 20 (pH 7,0) por 30 segundos em temperatura ambiente, sem agitação;
5. Deixe secar em temperatura ambiente;
6. Aplicar 15 µl de DAPI.
7. Cobrir com lamínula (24x32) e guardar a lâmina em uma caixa escura, por no mínimo 10 minutos, antes de observar em microscópio de fluorescência.

As lâminas devem ser armazenadas em caixas escuras por no máximo 1 mês em geladeira.

f) Anexo 06. Protocolo da FISH em mucosa oral

Composição das soluções necessárias para realização da FISH em mucosa oral:

Solução 20x SSC pH 5,3 – Solução mãe

87,67g NaCl

44,12g citrato de sódio

Dissolver o NaCl e o citrato de sódio em 400mL de água destilada, ajustar o pH com HCL 1M e depois colocar 100mL de água destilada (volume final de 500mL) ajustando o pH novamente para 5,3, filtrar e conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

Solução 2xSSC

10mL 20xSSC

90mL água destilada estéril

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5M. Conservar em geladeira. Descartar após 6 meses.

Pepsina 5%

1g de pepsina

19ml de água milique

Pepsina

40ml de água milique

40µl de HCl concentrado

400µl de pepsina 5%

Etanol 100%

50mL

Solução PBS 10X pH 7,4 (Solução mãe)

80g NaCl

2g KCl

14,4g Na₂HPO₄

Solução PBS 1x pH 7,2

450mL de água destilada

50 PBS 1x

Solução Formadido 1% /PBS 1x

2,7 mL de formaldeído 37%

100mL de PBS 1x pH 7,2

Etanol 70%

35 mL etanol 100%

15 mL água destilada estéril

Etanol 85%

42,5 mL etanol 100%

7,5 mL água destilada estéril

Etanol 100%

40mL etanol 100%

Solução 2xSSC/formamida 70%

28mL de formamida

12mL 2xSSC

Solução 2x SSC/ 0,05 % Tween 20

40ml de 2xSSC

20µl Tween 20

Solução 0,4XSSC/0,15% Tween 20

40ml de 2xSSC

60µl Tween 20

Protocolo:

a) Pré-tratamento

- Colocar a lâmina em 2xSSC à 73°C por 2 minutos;
- Colocar na solução de pepsina à 37°C por 40 minutos;
- Lavar duas vezes com PBS 1x;
- Colocar a lâmina na solução PBS1x/formol puro por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Lavar duas vezes com PBS 1x;
- Passar no etanol gelado – 70, 85 e 100%/ 1 minuto por concentração.

b) Pré-desmaturação

- Colocar no 2xSSC/formamida 70% à 73°C por 2 minutos;
- Passar no etanol gelado – 70, 85 e 100%/ 1 minuto por concentração.
- Secar em temperatura ambiente;
- Colocar 5µl de sonda, cobrir com lamínula e colar com cola especial;

- Deixar por 10 minutos na chapa aquecedora à 73°C;
- Armazenar a lâmina em uma caixa úmida e escura por aproximadamente 20 horas.

c) Lavagem

- Remover a lamínula e a cola;
- Colocar a lâmina no 2xSSC à 37°C por 5 minutos;
- Colocar a lâmina no 0,4xSSC/0,15% tween 20 à 73°C por 2 minutos;
- Passar no 2xSSC em temperatura ambiente;
- Passar na água milique;
- Secar em temperatura ambiente;
- Colocar 5µl de DAPI, cobrir com lamínula.